

Induksi Kalus dan Penghasilan Capsaicin pada Variasi Kadar Nutrien MS dan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh

Combination of MS Nutrient Level and Plant Growth Regulator for Callus Induction and Capsaicin Production

Eveline Kurniati, E. Mursyanti, L. M. Ekawati Purwijantiningsih
Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta
Jln. Babarsari No. 44, Yogyakarta 55281
evelinekurniati@yahoo.com

ABSTRAK

Capsaicin merupakan salah satu metabolit sekunder tanaman cabai yang memberikan rasa pedas pada buah cabai dan bersifat iritan. Modifikasi komposisi medium pada kultur *in vitro* dapat digunakan untuk meningkatkan penghasilan capsaicin. Salah satu cara untuk meningkatkan penghasilan metabolit sekunder capsaicin adalah dengan meningkatkan kadar garam dan sukrosa medium yang berakibat menurunnya potensial air medium (stres air). Penelitian bertujuan untuk mendapatkan kadar nutrien dan kombinasi zat pengatur tumbuh yang paling optimal dalam penghasilan capsaicin secara kuantitatif melalui induksi kalus dari eksplan hipokotil cabai rawit (*Capsicum frutescens*) putih. Penelitian menggunakan variasi kadar nutrien MS ($\frac{1}{2}$ resep medium MS, $\frac{3}{4}$ resep medium MS, 1 resep medium MS, $1\frac{1}{4}$ resep medium MS, dan $1\frac{1}{2}$ resep medium MS) dan kombinasi auksin-sitokinin (1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BAP, 2 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kin, 0,04 mg/L IAA + 2 mg/L BAP). Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium 1 MS dengan penambahan IAA + BAP dapat menginisiasi kalus tercepat (5,67 hari), berat basah kalus terbesar (0,67 g), dan dapat menginduksi eksplan (100%). Tingginya kadar nutrien medium MS dan penambahan kombinasi ZPT cenderung meningkatkan kandungan capsaicin. Medium $1\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan 2,4-D + Kin atau IAA + BAP dapat meningkatkan kandungan capsaicin 1,2 kali dibandingkan dengan medium 1 MS + 2,4-D + Kin atau 1 MS + IAA + BAP dan dapat meningkatkan kandungan capsaicin 1,4 kali dibandingkan dengan medium $1\frac{1}{2}$ MS kontrol.

Kata kunci: *Capsicum frutescens*, induksi kalus, capsaicin

PENDAHULUAN

Cabai (*Capsicum*) merupakan tanaman budidaya yang buahnya bersifat iritan (Cairns, 2004) dan mempunyai rasa pedas. Sifat iritan memberikan sensasi seperti terbakar (*burning sensation*) jika kontak dengan mata atau membran mukus yang lain. Walaupun demikian, buah cabai yang bersifat iritan berguna sebagai analgesik jika dioleskan pada kulit

(Anogianaki, 2006). Menurut Cairns (2004), sifat iritan di dalam buah-buahan berbagai spesies cabai tersebut dikarenakan adanya kandungan capsaicin.

Capsaicin merupakan salah satu metabolit sekunder pada tanaman cabai. Capsaicin terdapat pada plasenta buah, tempat melekatnya biji (Astawan dan Kasih, 2008). Manfaat capsaicin telah diteliti, antara lain digunakan sebagai pestisida kumbang kentang Colorado (Maliszewska and Tegowska, 2011), sebagai antibiotik *Helicobacter pylori* (Zeyrek and Oguz, 2005), sebagai antifungal *Phytophthora capsici* Leo. (Mojica-Marín *et al.*, 2011).

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), metode yang sering digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder tumbuhan adalah kultur *in vitro*. Kultur *in vitro* termasuk teknik perbanyakan tanaman secara vegetatif buatan berdasar pada sifat totipotensi tumbuhan. Kultur *in vitro* tumbuhan menjadi suatu alternatif untuk meningkatkan metabolit sekunder yang mempunyai nilai komersial tinggi, tetapi sulit untuk diperoleh secara pertanian konvensional (Siregar dkk., 2006).

Kultur *in vivo* pada lahan kekurangan air terbukti dapat meningkatkan kadar capsaicin pada buah cabai (Sung *et al.*, 2005). Penelitian ini mengadaptasikan kondisi kekurangan air tersebut pada kultur *in vitro* dengan kadar nutrisi medium *Murashige and Skoog* (MS) yang berbeda-beda. Menurut Kalidass *et al.* (2010), produksi metabolit sekunder pada kultur kalus dapat dikontrol melalui faktor lingkungannya, salah satunya adalah dengan memberi variasi pada komposisi medium.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2013 sampai Juli 2013 di Laboratorium Teknobi-Industri Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Pengujian Capsaicin dilakukan di

Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

Alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer, botol kultur, botol jam, petridish, autoklaf, gelas ukur, gelas beker, pinset, skalpel, *blade*, bunsen, botol *spray*, timbangan analitik, pH meter, *hot plate magnetic stirrer*, *laminair air flow*, *aluminium foil*, kertas payung, karet gelang, kertas saring, *plastic wrap*, lampu UV, kompor gas, asbes, sendok, gelas pengaduk, *tissue*, kain lap, kertas label, rak besi, *refrigerator*, *latex gloves*, masker, pipet ukur, *millipore membrane*, *syringe*, *micropipet*, oven, ayakan 60 mesh, *blender*, *vortex*, *plate* silika gel 60 F₂₅₄, pipa kapiler, KLT, densitometer, dan *digital camera*.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu kecambah cabai rawit putih (*Capsicum frutescens*) dari Esha Flora Bogor, alkohol 96%, air keran, akuades, medium MS (*Murashige and Skoog*), agar *bacteriological*, sukrosa, 2,4-D, IAA, BAP, Kin, etanol, metanol, toluen, kloroform, aseton, standard capsaicin (Sigma Aldrich).

Kecambah cabai rawit putih berumur 14 hari diletakkan dalam petridish dan dipotong bagian hipokotil 0,5 - 1 cm. Hipokotil ditanam pada medium MS dengan variasi kadar nutrien dan kombinasi auksin-sitokinin secara aseptis. Mulut botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil* dan disegel dengan *plastic wrap*. Botol kultur diletakkan di ruang inkubasi pada suhu 25 ± 2 °C.

Parameter yang diamati berupa waktu inisiasi terbentuknya kalus, persentase pertumbuhan kalus, berat basah kalus, kandungan capsaicin yang terkandung dalam kalus, morfologi (warna dan tekstur) kalus. Berat basah kalus dan kandungan capsaicin diukur pada minggu ke-9 setelah inokulasi. Total kandungan capsaicin diukur dengan menggunakan KLT-densitometer.

Data kuantitatif berupa waktu inisiasi kalus, persentase pertumbuhan kalus, berat basah kalus, dan kandungan senyawa capsaicin. Data waktu inisiasi kalus dan berat basah kalus dianalisis dengan ANAVA dengan tingkat kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui letak beda nyata antarperlakuan, sedangkan data persentase pertumbuhan kalus dan kandungan senyawa capsaicin dianalisis menggunakan metode deskriptif. Data kualitatif berupa morfologi kalus yang meliputi warna dan sifat kalus yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode deskriptif (Gaspersz, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Waktu Inisiasi Terbentuknya Kalus

Kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Kalus pertama kali terbentuk pada ujung eksplan hipokotil cabai rawit putih yang kontak dengan medium, tepatnya pada ujung eksplan yang terluka. Pembentukan kalus diawali dengan proses pembengkakan pada bagian eksplan yang terluka pada hari ke-3 sampai hari ke-6, kemudian diikuti dengan pembentukan kalus terjadi pada hari ke-5 sampai hari ke-8 setelah inokulasi eksplan.

Semua perlakuan pada penelitian ini dapat menginduksi terbentuknya kalus, termasuk perlakuan control. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan hipokotil cabai rawit putih yang kontak dengan medium dapat melakukan penyerapan nutrisi maupun ZPT. Penyerapan nutrisi maupun ZPT dimanfaatkan oleh sel-sel untuk melakukan pembelahan dan pertumbuhan sel-sel tersebut (Bhojwani dan Razdan, 1996).

Hasil analisis statistik (Tabel 1) menunjukkan bahwa variasi kadar nutrisi dan variasi kombinasi ZPT memengaruhi waktu inisiasi terbentuknya kalus. Medium 1 MS cenderung menginisiasi pembentukan kalus paling cepat dengan rerata waktu inisiasi

kalus 5,83 hari setelah inokulasi. Penggunaan kombinasi IAA + BAP cenderung menginisiasi pembentukan kalus paling cepat dengan rerata waktu inisiasi kalus 5,87 hari setelah inokulasi. Walaupun demikian interaksi antara perlakuan kadar nutrisi dan kombinasi ZPT tidak memengaruhi waktu inisiasi terbentuknya kalus hipokotil cabai rawit putih.

Tabel 1. Rata-rata Waktu Inisiasi Terbentuknya Kalus Eksplan Hipokotil Cabai Rawit Putih pada Medium dengan Variasi Kadar Nutrien MS dan Kombinasi ZPT (hari)

Kadar Nutrien	Kombinasi ZPT				Rerata
	1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP	2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l Kin	0,04 mg/l IAA + 2 mg/l BAP	Kontrol	
½ MS	6,67 ^a	6,67 ^a	6,33 ^a	6,67 ^a	6,58 ^B
¾ MS	6,33 ^a	6,67 ^a	5,67 ^a	7,00 ^a	6,42 ^B
1 MS	5,67 ^a	6,33 ^a	5,67 ^a	5,67 ^a	5,83 ^A
1¼ MS	5,67 ^a	5,67 ^a	5,67 ^a	6,67 ^a	5,92 ^A
1½ MS	6,33 ^a	7,33 ^a	6,00 ^a	7,67 ^a	6,83 ^B
Rerata	6,13 ^{AB}	6,53 ^{BC}	5,87 ^A	6,73 ^C	

B. Persentase Pertumbuhan Kalus

Tingkat keberhasilan eksplan hipokotil cabai rawit putih dapat diketahui dengan pengamatan persentase pertumbuhan kalus. Berdasarkan data pada Tabel 2, kalus mampu tumbuh pada semua perlakuan. Variasi kadar nutrisi pada medium MS tidak memberikan pengaruh pada persentase pertumbuhan kalus karena eksplan hipokotil cabai rawit putih mampu bertumbuh menjadi kalus 100% pada perlakuan 2,4-D + BAP dan perlakuan IAA + BAP. Variasi auksin-sitokinin yang digunakan dapat memengaruhi pertumbuhan kalus eksplan hipokotil cabai rawit putih. Persentase pertumbuhan kalus terendah dihasilkan oleh medium MS kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa adanya penambahan kombinasi ZPT lebih efektif untuk induksi kalus eksplan hipokotil cabai rawit putih. Kombinasi 2,4-D + BAP dan IAA + BAP merupakan kombinasi yang paling optimal untuk induksi kalus

karena dapat menghasilkan kalus 100%. Walaupun demikian kombinasi IAA + BAP lebih cepat menginduksi kalus dibandingkan 2,4-D + BAP.

Tabel 2. Persentase (%) Pertumbuhan Kalus Eksplan Hipokotil Cabai Rawit Putih pada Medium dengan Variasi Kadar Nutrien MS dan Kombinasi ZPT

Perlakuan		Minggu ke-			
		1	2	3	4
MS	ZPT	Persentase (%)	Persentase (%)	Persentase (%)	Persentase (%)
$\frac{1}{2}$	2,4-D + BAP	64,71	100,00	100,00	100,00
	2,4-D + Kin	47,62	52,38	80,95	85,71
	IAA + BAP	90,00	100,00	100,00	100,00
	Kontrol	31,58	47,37	73,68	78,95
$\frac{3}{4}$	2,4-D + BAP	87,50	100,00	100,00	100,00
	2,4-D + Kin	52,94	64,71	70,59	70,59
	IAA + BAP	71,43	100,00	100,00	100,00
	Kontrol	40,00	73,33	73,33	73,33
1	2,4-D + BAP	78,95	94,74	100,00	100,00
	2,4-D + Kin	50,00	75,00	80,00	80,00
	IAA + BAP	90,48	100,00	100,00	100,00
	Kontrol	31,82	68,18	72,73	72,73
$1\frac{1}{4}$	2,4-D + BAP	65,00	100,00	100,00	100,00
	2,4-D + Kin	60,87	69,57	91,30	91,30
	IAA + BAP	88,89	100,00	100,00	100,00
	Kontrol	52,94	52,94	52,94	52,94
$1\frac{1}{2}$	2,4-D + BAP	58,82	100,00	100,00	100,00
	2,4-D + Kin	27,78	66,67	66,67	77,78
	IAA + BAP	66,67	80,95	80,95	100,00
	Kontrol	20,00	60,00	60,00	65,00

C. Berat Basah Kalus

Berat basah kalus merupakan parameter untuk mengetahui adanya pembelahan dan pembesaran sel pada biomassa kalus. Hasil analisis statistik pada Tabel 3 menunjukkan adanya pengaruh dari perlakuan variasi kadar nutrien dan variasi kombinasi ZPT terhadap berat basah kalus. Rerata berat basah kalus pada variasi kadar nutrien cenderung mengalami peningkatan berat basah kalus dari medium $\frac{1}{2}$ MS sampai medium 1 MS, tetapi mengalami penurunan rerata berat basah kalus kembali seiring meningkatnya kadar nutrien. Rerata berat basah kalus pada variasi kombinasi ZPT lebih besar daripada rerata berat basah kalus pada medium control. Penggunaan medium 1 MS

dan kombinasi IAA + BAP menghasilkan rerata berat basah kalus terbesar. Interaksi antara kadar nutrisi dan kombinasi ZPT memberikan pengaruh terhadap berat basah kalus. Interaksi antara perlakuan 1 MS dengan penambahan IAA + BAP menghasilkan berat basah kalus terbesar.

Tabel 3. Rata-rata Berat Basah Kalus Eksplan Hipokotil Cabai Rawit Putih Minggu ke-9 pada Medium dengan Variasi Kadar Nutrien MS dan Kombinasi ZPT (g)

Kadar Nutrien	Kombinasi ZPT				Rerata
	1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP	2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l Kin	0,04 mg/l IAA + 2 mg/l BAP	Kontrol	
1/2 MS	0,15 ^{abc}	0,10 ^{ab}	0,23 ^{bcd}	0,06 ^a	0,14 ^A
3/4 MS	0,17 ^{abc}	0,15 ^{abc}	0,23 ^{bcd}	0,10 ^{ab}	0,16 ^{AB}
1 MS	0,31 ^{cd}	0,14 ^{ab}	0,67 ^e	0,13 ^{ab}	0,31 ^C
1 1/4 MS	0,24 ^{bcd}	0,17 ^{abc}	0,34 ^d	0,13 ^{ab}	0,22 ^B
1 1/2 MS	0,19 ^{abcd}	0,12 ^{ab}	0,26 ^{bcd}	0,10 ^{ab}	0,17 ^{AB}
Rerata	0,21 ^B	0,13 ^A	0,35 ^C	0,10 ^A	

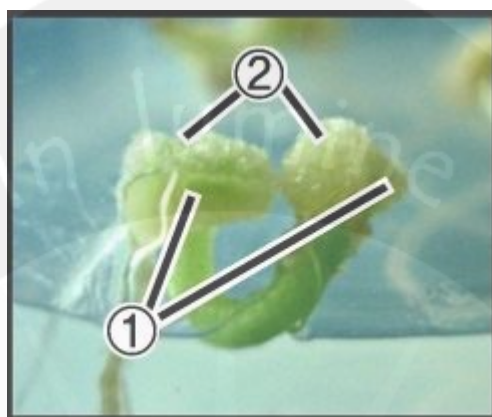
D. Morfologi Kalus

Parameter pengamatan morfologi kalus bertujuan untuk melihat ciri-ciri fenotip kalus yang terbentuk. Parameter morfologi kalus yang diamati adalah tekstur kalus dan warna kalus. Hasil pengamatan morfologi kalus pada semua perlakuan berupa kalus intermediet. Kalus dengan tekstur intermediet terdiri dari sekumpulan sel yang kuat pada bagian dalam dan sekumpulan sel yang mudah lepas pada bagian luar (Gambar 1).

Warna kalus hipokotil cabai rawit putih pada masa inisiasi berwarna putih dan mengalami perubahan warna menjadi putih kekuningan seiring bertambahnya umur kalus dan bertambahnya biomassa sel. Kalus pada minggu ke-3 mulai mengalami *browning*, ditandai dengan perubahan warna kalus menjadi kuning kecokelatan.

Browning dapat dicegah dengan beberapa perlakuan. Pertama, perlakuan gelap yang mencegah aktivitas peroxidase (Chen *et al.*, 2002). Kedua, penambahan antioksidan yang menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase (Tang and Newton, 2004).

Antioksidan yang biasa digunakan adalah asam askorbat, asam sitrat (Khosroushahi *et al.*, 2011), dan sistein (Jain *et al.*, 2008). Ketiga, penggunaan bahan adsorben pada medium seperti arang aktif (*charcoal*) (Jain *et al.*, 2008). Keempat, subkultur secara berkala (Aghabozorgi, 2006).



Gambar 1. Penampakan tekstur intermediet kalus hipokotil cabai rawit putih umur 5 minggu pada medium 1 MS kombinasi 2,4-D + BAP (Dokumentasi Pribadi)
Keterangan: 1 = tekstur remah pada permukaan kalus, 2 = tekstur kompak

E. Induksi Kalus

Berdasarkan parameter-parameter pengamatan kalus di atas, dikelaskan bahwa medium 1 MS merupakan medium yang seimbang di mana komposisi nutrisi pada medium 1 MS dapat secara optimal memacu kecepatan inisiasi kalus, persentase pertumbuhan kalus, berat basah kalus. Rendahnya kadar nutrisi dapat memperlambat induksi kalus karena minimnya nutrisi yang ada pada medium. Tingginya kadar nutrisi dapat menurunkan potensial air medium yang membuat penyerapan nutrisi terhambat.

Kombinasi IAA + BAP merupakan kombinasi yang efektif dan lebih mendominasi untuk induksi kalus. Penggunaan auksin pada konsentrasi tinggi lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Konsentrasi 2,4-D (1 mg/L dan 2 mg/L) lebih tinggi daripada IAA (0,04 mg/L) kemungkinan bersifat menghambat induksi kalus.

F. Kandungan Capsaicin

Produksi senyawa metabolit sekunder dengan kultur *in vitro* merupakan suatu sarana yang dianggap lebih menguntungkan karena zat hara dalam kultur *in vitro* dapat diatur untuk memengaruhi metabolisme sehingga dapat diperoleh hasil yang diharapkan (Kurz dan Constabel, 1991). Penelitian ini mengadaptasi biosintesis capsaicin secara *in vivo* dalam kondisi kekurangan air pada medium MS (secara *in vitro*). Sung *et al.* (2005) menyatakan bahwa stress air memacu biosintesis capsaicin.

Berdasarkan data Tabel 4, kalus hipokotil cabai rawit putih pada semua perlakuan mengandung capsaicin. Kandungan capsaicin berbanding lurus dengan kadar garam dan sukrosa pada medium MS atau berbanding terbalik dengan potensial air medium. Kandungan capsaicin relative lebih tinggi pada medium MS dengan penambahan ZPT dibandingkan dengan pada medium MS control. Kandungan capsaicin tertinggi diperoleh pada medium 1½ MS dengan kombinasi 2,4-D + Kin dan IAA + BAP (0,351 µg dalam 0,04 g kalus kering hipokotil cabai rawit putih), diikuti 2,4-D + BAP (0,333 µg dalam 0,04 g kalus kering hipokotil cabai rawit putih) dan kontrol (terendah dengan 0,250 µg capsaicin dalam 0,04 g berat kering kalus eksplan hipokotil cabai rawit putih). Medium 1½ MS dengan penambahan 2,4-D + Kin atau IAA + BAP dapat meningkatkan kandungan capsaicin 1,2 kali dibandingkan dengan medium 1 MS + 2,4-D + Kin atau 1 MS + IAA + BAP dan dapat meningkatkan kandungan capsaicin 1,4 kali dibandingkan dengan medium 1½ MS kontrol.

Rendahnya kandungan capsaicin pada medium MS kontrol disebabkan oleh tidak adanya auksin eksogen atau sitokinin eksogen yang ditambahkan pada medium kultur. Rahayu dkk. (2003) menyatakan bahwa auksin berfungsi untuk meningkatkan kerja enzim PAL. Peningkatan kerja enzim PAL ini juga meningkatkan biosintesis

capsaicin (Ochoa-Alejo and Gómez-Peralta, 1993; Blum *et al.*, 2003; Sung *et al.*, 2005). Negi (2011) menambahkan bahwa 2,4-D dan IAA bertanggung jawab terhadap pertumbuhan dan pembentukan alkaloid pada kultur suspensi *Catharanthus roseus*. Penelitian Santoro *et al.* (2013) menunjukkan bahwa dengan penambahan BAP pada medium MS dapat meningkatkan aktivitas metabolisme primer (pertumbuhan dan morfogenesis) *Peppermint* tanpa terjadi penurunan aktivitas metabolisme sekunder.

Produksi capsaicin melalui kultur kalus ini relatif rendah jika dibandingkan dengan kandungan capsaicin pada buah cabai rawit putih (Sukrasno dkk., 1997) maupun produksi capsaicin melalui kultur suspensi sel (Kehie *et al.*, 2012) dan kultur imobilisasi sel (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa metode kultur kalus kurang efektif untuk memproduksi metabolit sekunder capsaicin dalam jumlah yang besar. Selain itu, produksi metabolit sekunder dapat dipacu dengan adanya prekursor pada medium (Nunez-Palenius and Ochoa-Alejo, 2005 dan Prasad *et al.*, 2005).

Tabel 4. Kandungan Capsaicin Kalus Eksplan Hipokotil Cabai Rawit Putih pada Medium dengan Variasi Kadar Nutrien MS dan Kombinasi ZPT (μg)

Kadar Nutrien	Kombinasi ZPT			
	1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP	2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l Kin	0,04 mg/l IAA + 2 mg/l BAP	Kontrol
½ MS	0,259	0,261	0,262	0,212
¾ MS	0,264	0,266	0,279	0,241
1 MS	0,281	0,283	0,285	0,242
1¼ MS	0,286	0,296	0,322	0,250
1½ MS	0,333	0,351	0,351	0,250

SIMPULAN DAN SARAN

Induksi kalus terbaik dihasilkan dari eksplan hipokotil cabai rawit putih yang ditanam pada medium 1 MS, walaupun untuk penghasilan capsaicin terbaik ditemukan pada medium 1½ MS. Induksi kalus terbaik dihasilkan dari eksplan hipokotil cabai rawit putih yang

ditanam pada medium dengan penambahan IAA + BAP, sedangkan untuk penghasilan capsaicin terbaik ditemukan pada medium dengan penambahan 2,4-D + Kin dan IAA + BAP.

Usaha penurunan persentase *browning* dapat dilakukan dengan cara subkultur secara berkala, penambahan *antibrowning agent* (antioksidan, adsorben), atau perlakuan gelap. Produksi senyawa capsaicin secara lebih lanjut dapat ditambahkan precursor untuk memacu biosintesis capsaicin atau dapat menggunakan kultur suspensi sel dan imobilisasi sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Aghabozorgi, M. 2006. The Study of Rooting Response of Some Horticulture Plants After Inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Thesis*. Ferdowsi University of Mashhad. Iran.
- Anogianaki, A., Negrev, N. N., Shaik, Y. B., Castellani, M. L., Frydas, S., Vecchiet, J., Tete, S., Salini, V., Amicis, D. D., Lutiis, M. A. D., Conti, F., Caraffa, A., and Cerulli, G. 2006. Capsaicin An Irritant Anti-inflammatory Compound. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 1-4.
- Astawan, M. dan Kasih, A. L. 2008. *Khasiat Warna Warni Makanan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Blum, E., Mazourek, M., O'Connell, M., Curry, J., Thorup, T., Liu, K., Jahn, M., and Paran, I. 2003. Molecular Mapping of Capsaicinoid Biosynthesis Genes and Quantitative Trait Loci Analysis for Capsaicinoid Content in Capsicum. *Theor Appl Genet*. 103:79-86.
- Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. 1996. *Plant Tissue Culture*. Elsevier Science B.V. Netherlands.
- Cairns, D. 2004. *Intisari Kimia Farmasi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Chen, L. M., Cheng, J. T., Chen, E. L., Yiu, T. J., and Liu, Z. H. 2002. Naphthaleneacetic Acid Suppress Peroxidase Activity During The Induction of Adventitious Root in Soybean Hypocotyls. *J. Plant Physiol*. 159:1349-1354.
- Hendaryono, D. P. S. dan Wijayani, A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif Modern*. Kanisius. Yogyakarta.
- Jain, S., Kharya, M. D., Nayak, S., and Barik, R. 2008. Effect of Antioxidants on Callus Browning of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Natural Remedies*. 44-47.

- Kalidass, C., Mohan, V. R., and Daniel, A. 2010. Effect of Auxin and Cytokinin on Vincristine Production by Callus Culture of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12:283-288.
- Kehie, M., Kumaria, S., and Tandon, P. 2012. Osmotic Stress Induced Capsaicin Production in Suspension Cultures of *Capsicum chinense* Jacq.cv. Naga King Chili. *Acta Physiol Plant*. 34(2).
- Khosroushahi, A. Y., Naderi-Manesh, H., and Simonsen, H. T. 2011. Effect of Antioxidants and Carbohydrates in Callus Cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of Browning, Callus Growth, Total Phenolics and Paclitaxel Production. *BioImpacts*. 1(1):37-45.
- Kurz, W. G. W. dan Constabel, F. 1991. Produksi dan Isolasi Metabolit Sekunder. Dalam Wetter, L. R. dan Constabel, F. (eds). *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Penerjemah: Widiyanto, M. B. ITB Press. Bandung.
- Maliszewska, J. and Tegowska, E. 2011. Capsaicin as An Organophosphate Synergist Against Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Journal of Plant Protection Research*. 52(1):28-34.
- Mojica-Marín, V., Luna-Olvera, H. A., Sandoval-Coronado, C. F., Morales-Ramos, L. H., González-Aguilar, N. A., Pereyra-Alférez, B., Ruiz-Baca, E., and Elías-Santos, M. 2011. In Vitro Antifungal Activity of Gobernadora (*Larrea tridentata* (D. C.) Coville) Against *Phytophthora capsici* Leo. *African Journal of Agricultural Research*. 6(5):1058-1066.
- Negi, R. S. 2011. Fast In-Vitro Callus Induction in *Catharanthus roseus* – A Medicinally Important Plant Used in Cancer Therapy. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological, and Chemical Sciences*. 2(4):597-603.
- Nunez-Palenius, H. G., and Ochoa-Alejo, N. 2005. Effect of Phenylalanine and Phenylpropanoids on The Accumulation of Capsaicinoids and Lignin in Cell Cultures of Chili Pepper (*Capsicum Annuum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 41:801-805.
- Ochoa-Alejo, N. and Gómez-Peralta, J. E. 1993. Activity of Enzymes Involved in Capsaicin Biosynthesis in Callus Tissue and Fruits of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Physiol*. 141:147-152.
- Prasad, B. C. N., Gururaj, H. B., Kumar, V., Giridhar, P., Parimalan, R., Sharma, A., and Ravishankar, G. A. 2005. Influence of 8-Methyl-Nonenoic Acid on Capsaicin Biosynthesis in In Vivo and In Vitro Cell Cultures of *Capsicum* Spp. *Central Food Technological Research Institute*. India.
- Rahayu, B., Solichatun, dan Anggarwulan, E. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofrms*. 1(1):1-6.

- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A. 2000. Biotransformation of Protocatechuic Aldehyde and Caffeic Acid to Vanillin and Capsaicin in Freely Suspended and Immobilized Cell Culture of *Capsicum frutescens*. *J. Biotechnol.* 76:137-146
- Santoro, M. V., Nievas, F., Zygadlo, J., Giordano, W., and Banchio, E. 2013. Effects of Growth Regulators on Biomass and The Production of Secondary Metabolites in Peppermint (*Mentha piperita*) Micropopagated in Vitro. *American Journal of Plant Sciences.* 4:49-55.
- Siregar, L. A. M., Keng, CL. dan Lim, BP. 2006. Pertumbuhan dan Akumulasi Alkaloid dalam Kalus dan Suspensi Sel *Eurycoma longifolia* Jack. *Jurnal Ilmiah Pertanian KULTURA.* 41(1):19-27.
- Sukrasno, Kusmardiyani, S., Tarini, S., Sugiarto, N. C. 1997. Kandungan Kapsaisin dan Dihidrokapsaisin pada Berbagai Buah *Capsicum*. *JMS.* 2:28 – 34.
- Sung, Y., Chang, Y. Y., and Ting, N. L. 2005. Capsaicin Biosynthesis in Water-Stresses Hot Pepper Fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 46:35-42.
- Tang, W. and Newton, R. J. 2004. Increase of Polyphenol Oxidase and Decrease of Polyamines Correlate with Tissue Browning in Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Sci.* 167:621-628.
- Zeyrek, F. Y. and Oguz, E. 2005. In Vitro Activity of Capsaicin Against *Helicobacter pylori*. *Annals of Microbiology.* 55(2):125-127.